

PENT COOPERATION TREA

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)Date of mailing (day/month/year)
18 August 2000 (18.08.00)Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

International application No.
PCT/CH98/00498Applicant's or agent's file reference
150031.1/FI/mbInternational filing date (day/month/year)
19 November 1998 (19.11.98)

Priority date (day/month/year)

Applicant

MEHLEM, Francesco et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made: in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

31 May 2000 (31.05.00)

 in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election was was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Claudio Borton

Telephone No.: (41-22) 338 83.38

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | | |
|---|--|--|--|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 5/08 | | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/31119 |
| | | | (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. Juni 2000 (02.06.00) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/CH98/00498 | | (81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, HU, IL, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). | |
| (22) Internationales Anmeldedatum: 19. November 1998 (19.11.98) | | Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> | |
| (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PEPTI-CHEMIO AG [CH/CH]; Rabbentalstrasse 83, CH-3000 Bern 25 (CH). | | | |
| (72) Erfinder; und | | | |
| (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MEHLEM, Francesco [IT/CH]; Lindenhofstrasse 2, CH-3048 Worblauken (CH). DI VITTORIO, Pietro [IT/IT]; Via A. Storza, 65, I-20100 Milano (IT). | | | |
| (74) Anwalt: BOVARD AG; Optingenstrasse 16, CH-3000 Bern 25 (CH). | | | |

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING L-PROLYL-L-M-SARCOLYSYL-L-P-FLUOROPHENYLALANINE AND DERIVATIVES THEREOF

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON L-PROLYL-L-M-SARCOLYSYL-L-P-FLUOROPHENYLALANIN UND VON DERIVATEN DAVON

(57) Abstract

The invention relates to the production of L-prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanine and to the lower alkyl ester and/or acid addition salts thereof. To this end L-p-fluorophenylalanine presenting a protected carboxyl group is reacted with L-m-sarcolysine. This yields L-m-sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanine presenting a protected amino group and a protected carboxyl group. The amino protective group is then split off, resulting in the formation of L-m-sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanine presenting a protected carboxyl group. The resulting product is reacted with proline presenting a protected amino group in the presence of dicyclohexylcarbodiimide, so that L-prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanine with a protected amino group is obtained. Finally the amino protective group is split off and possibly the lower alkyl ester group split off and/or the resulting compound transformed into an acid addition salt.

(57) Zusammenfassung

Es werden L-Prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanin, der Niederalkylester und/oder Säureadditionssalzen davon hergestellt. Hierzu wird L-p-Fluorphenylalanin mit einer geschützten Carboxyl-Gruppe mit L-m-Sarcolysin mit einer geschützten Aminogruppe vorzugsweise unter Kühlung in einem wasserfreien Medium in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid umgesetzt, wobei L-m-Sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanin mit einer geschützten Aminogruppe und einer geschützten Carboxyl-Gruppe erhalten wird. Anschliessend wird die Aminoschutzgruppe abgespalten, unter Bildung von L-m-Sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanin mit einer geschützten Carboxyl-Gruppe. Das erhaltene Produkt wird mit Prolin mit einer geschützten Aminogruppe in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid umgesetzt. Es wird L-Prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanin mit einer geschützten Aminogruppe erhalten. Schliesslich wird die Amino-Schutzgruppe abgespalten und gegebenenfalls die Niederalkylestergruppe abgespalten und/oder die erhaltene Verbindung in ein Säureadditionssalz übergeführt.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Leitland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidschan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauretanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |
| EE | Estland | | | | | | |

Verfahren zur Herstellung von L-prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanin und von Derivaten davon

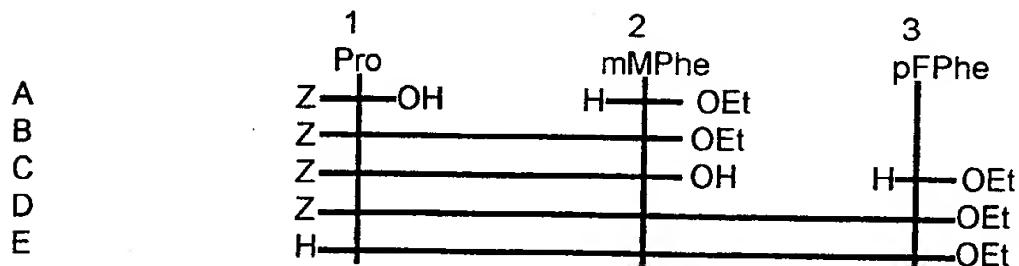
Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutisch aktiven Peptidverbindung, die L-m-Sarcolysin als Aminosäurebaustein enthält. Der Wirkstoff dient insbesondere zur Chemotherapie gegen Krebsleiden, besonders gegen Melanome. Bei Verwendung einer Trägersubstanz auf Basis von Cyclodextrin wird der Wirkstoff verzögert freigesetzt, was eine genügende Bioverfügbarkeit während einer ausreichend langen Zeitdauer ermöglicht.

Ein Komplex von sechs Peptiden, die m-L-Sarcolysin enthalten, ist unter dem Warennamen „Peptichemio“ (Istituto Sieroterapico Milanese S. Belfanti, Milano, IT) für die Chemotherapie gegen Krebs bekannt geworden. Es wurde gefunden, dass die Aktivität der einzelnen Peptide verschieden ist und dass besonders ein Vertreter eine sehr hohe Toxizität für Melanomzellen aufweist. Die Peptide sind eine Entwicklung, welche mit dem Produkt „Melphalan“, d.h. 4-[bis(2-Chlorethyl)]-amino-L-phenylalanin begonnen hat. Es wurde gefunden, dass dieses Produkt eine zytostatische Wirkung hat und sowohl für die Myelom- als auch für die Melanomtherapie eingesetzt werden kann. Zur Weiterentwicklung des Wirkstoffes wurden Derivate des Produktes hergestellt. Daraus resultierte auch das L-m-Sarcolysin [= m-{Di-2-chlorethyl)amino}-L-phenylalanin], das weiter deriviert wurde, indem Peptide hergestellt wurden, welche die modifizierte Aminosäure als Baustein enthielten. Eine Kombination der 6 Oligopeptiden L-Seryl-L-p-fluorophenylalanyl-L-m-sarcolysyl-ethylester; L-Prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanin-ethylester; L-m-Sarcolysyl-N-nitro-L-arginyl-L-norvalin-ethylester; L-p-Fluorophenylalanyl-L-m-sarcolysil-L-asparagin-ethylester; Fluorophenylalanyl-glycyl-L-m-sarcolysyl-norvalin-ethylester und L-m-Sarcolysyl-L-arginyl-L-lysyl-L-m-sarcolysyl-L-histidin-methylester bildete das aktive Prinzip der Antitumormittel „Peptichemio“. Von den 6 Peptiden haben sich das L-Prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanin (PSF) und seine Niederalkylester als besonders geeignet erwiesen.

Es wurde gefunden, dass PSF eine beträchtlich höhere Zytotoxizität im Vergleich zum Peptichemio selbst zeigte (R. Levenson, et al., Radiumhemmet, Karolinska Hospital, Stockholm SE, Eur. J. Cancer Clin. Oncol.; 23: 6, 783-788, 1987). Gemäss diesen Studien wurde gefunden, dass 5 das Peptid L-Propyl-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin (PSF) 35 x bzw. 28 x toxischer gegen RPMI 8322 Melanomzellen war als Melphalan bzw. m-Sarcolysin. Ähnliche Unterschiede zwischen den Wirkstoffen wurden auch für andere Melanomzelllinien gefunden.

Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur 10 Herstellung von PSF Verfügung zu stellen, das eine wirtschaftliche und sichere Herstellung des Wirkstoffes ermöglicht.

Die Herstellung einer solchen Verbindung ist in den Druckschriften BE-A-775775 und US-A-3 814 746 beschrieben. Die beschriebene Herstellung erfolgt nach dem nachstehenden Schema 1:



15

Pro = Prolin
 mMPhe = m-[Di(2-chlorethyl)]-amino-L-phenylalanin
 pFPhe = p-Fluor-L-phenylalanin
 Z = Benzyloxycarbonyl

20 Das obige Schema zeigt in Stufe A die Kondensation des N-Carbobenzoxy-L-prolin mit dem Ethylester von m-[Di-(2-chlorethyl)-amino]-L-phenylalanin, wobei das entsprechende geschützte Peptid entsteht, wie dies bei Stufe B im Schema 1 gezeigt ist.

In Stufe C erhält man das N-Carbobenzoxy-L-prolyl-m-[di-(2-chlorethyl)-amino]-L-phenylalanin aus dem N-Carbobenzoxy-L-prolyl-m-[di-(2-chlorethyl)-amino]-L-phenylalaninethylester und anschliessend führt man die Kondensation dieser Verbindung mit p-Fluor-L-phenylalaninethylester durch, wobei man in Stufe D

5 des Schemas 1 den Carbobenzoxy-L-prolyl-m-[di-(2-chlorethyl)amino]-L-phenylalanin-p-chlor-L-phenylalaninethylester erhält.

Man eliminiert darauf die Schutzgruppe, wobei man in Stufe E des Schemas 1 ankommt, wobei das Endprodukt der L-Prolyl-m-[di-(2-chlorethyl)amino]-L-phenylalanin-p-fluor-L-phenylalaninethylester ist.

10 Die Reaktionsbedingungen sind solche, welche im allgemeinen bei Peptidsynthesen verwendet werden. Beim obigen Verfahren wird das Endprodukt mit einer Ausbeute von 30 % erhalten, bezogen auf das Ausgangsprodukt m-[Di-(2-chlorethyl)amino]-L-phenylalaninethylester, wobei die Reinigung mindestens eines Zwischenproduktes durch

15 Säulenchromatographie auf Kieselgel durchgeführt werden muss.

Tatsächlich ist das Verfahren industriell anwendbar, jedoch ist es verhältnismässig kompliziert und führt zu einer eher ungenügenden Ausbeute.

Zieht man die Eigenschaften des Endproduktes PSF-Hydrochlorid in Betracht, ist die Verwirklichung eines anderen Herstellungsverfahrens, welches leicht

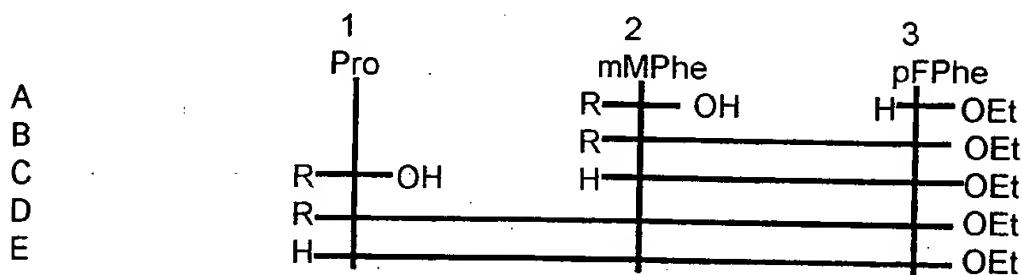
20 industriell angewandt werden kann, welches bessere Ausbeuten gegenüber demjenigen des Standes der Technik ergibt, eine aussergewöhnlich wichtige und interessante Aufgabe der vorliegenden Erfindung.

Es wurde gefunden, dass das erfindungsgemäss Herstellungsverfahren von PSF, das eine andere Reaktionsfolge verwendet, dem Verfahren des Standes

25 der Technik überlegen ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist demzufolge das im Patentanspruch 1 definierte Verfahren zur Herstellung von L-Prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin und von Estern und/oder Salzen davon.

Das erfindungsgemäße Verfahren erfolgt gemäss dem nachstehenden Schema 2:



Pro = Prolin

5 mMphe = m-[Di(2-chlorethyl)]-amino-L-phenylalanin (=L-m-Sarcolysin)

pFphe = p-Fluor-L-phenylalanin

R = Benzyloxycarbonyl, t-Butoxycarbonyl (BOC) oder
9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)

Das Verfahren umfasst folgende Verfahrensschritte, die im obigen Schema 2
10 dargestellt sind:

- a) Kondensation von R-m-[Di(2-chlorethyl)amino]-L-phenylalanin mit p-Fluor-L-phenylalaninethylester, wobei R-m-[Di(2-chlorethyl)amino]-L-phenylalanyl-p-fluor-L-phenylalaninethylester erhalten wird;
- b) Abspaltung der Schutzgruppe R;
- 15 c) Kondensation des im Schritt b) erhaltenen Produktes mit R-L-Prolin, wobei R-L-Prolyl-m-[di(2-chlorethyl)amino]-L-phenylalanyl-p-fluor-L-phenylalaninethylester erhalten wird;
- d) Abspaltung der Schutzgruppe R und Synthese des Hydrochlorides;
- 20 R kann Benzyloxycarbonyl, t-Butyloxycarbonyl oder 9-Fluorenylmethoxycarbonyl sein. R ist vorzugsweise eine Benzyloxycarbonylgruppe.

Das Verfahren gemäss der vorliegenden Erfindung zeigt eine Ausbeute von insgesamt 50 % bezogen auf das Ausgangsprodukt R-m-[Di(2-chlorethyl)amino]-L-phenylalanin.

Das Verfahren gemäss der vorliegenden Erfindung zeigt einen grossen Vorteil zur Durchführung der Synthese des Endproduktes, da kristalline Zwischenprodukte erhalten werden, welche aussergewöhnlich leicht durch Kristallisation gereinigt werden können.

5 Die Merkmale und die Vorteile des erfindungsgemässen Verfahrens sollen zum besseren Verständnis durch die nachstehende Beschreibung erläutert werden. Das Tripeptid, welches nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellt wird, wird gemäss dem obigen Schema 2 hergestellt. Darin ist R eine Benzyloxycarbonyl oder t-Butoxycarbonylgruppe (BOC) oder
10 eine 9-Fluorenylmethoxycarbonylgruppe (Fmoc).

Das Verfahren sieht, wie aus dem Schema 2 hervorgeht, in Stufe A die Kondensation von R-m-[Di-2-chlorethyl]amino]-L-phenylalanin mit dem Ethylester des p-fluorphenylalanins vor, wobei in Stufe B das entsprechende geschützte Tripeptid entsteht.

15 In Stufe C wird die Benzyloxycarbonylgruppe entfernt, und durch eine Kondensation des R-L-Prolins mit m-[Di-(2-chlorethyl)amino]-L-phenylalanyl-p-fluor-L-phenylalaninethylester wird in Stufe D des Schemas 2 das R-L-Prolyl-m-[Di-2-chlorethyl]amino]-L-phenylalanyl-p-fluor-L-phenylalaninethylester erhalten.

20 Die Schutzgruppe R wird in Stufe E des Schemas 2 abgespalten, wobei das Endprodukt L-prolyl-m-[Di-(2-chlorethyl)amino]-phenylalanyl-p-fluor-phenylalaninethylester ist.

Die Reaktionsbedingungen sind solche, wie sie im allgemeinen bei der Peptidsynthese üblich sind.

25 Das Peptid L-Prolyl-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin (PSF) wird vorzugsweise in Form von Hydrochloriden oder Hydrobromiden hergestellt.

Das nachstende Beispiel dient der Erläuterung der vorliegenden Erfindung.

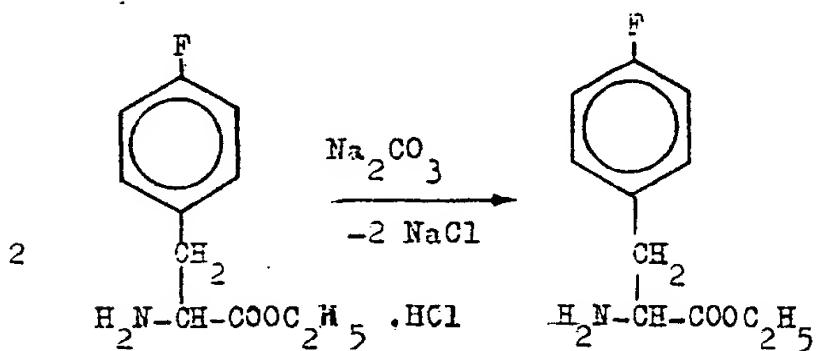
Beispiel:

Synthese von L-prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin-ethylester-hydrochlorid

a) N-Carbobenzoxy-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin-ethylester

5 52,5 g L-p-Fluorphenylalaninethylester Hydrochlorid werden mit 75 ml Na_2CO_3 (Natriumcarbonat) gesättigte Lösung und 150 ml CHCl_3 behandelt. Die Mischung wird ausgeschüttelt und die organische Phase wird getrennt und aufbewahrt. Die wässrige Phase wird mit 75 ml CHCl_3 ein zweites Mal ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformextrakte werden gemischt und

10 einmal mit Wasser gewaschen, und dann von der wässrigen Phase getrennt und auf wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet. Die Konzentration von Aminosäureester wird durch eine Titration mit HClO_4 (Perchlorsäure) bestimmt. Die Ausbeute entspricht ungefähr dem theoretischen Wert; sie liegt bei 98%.

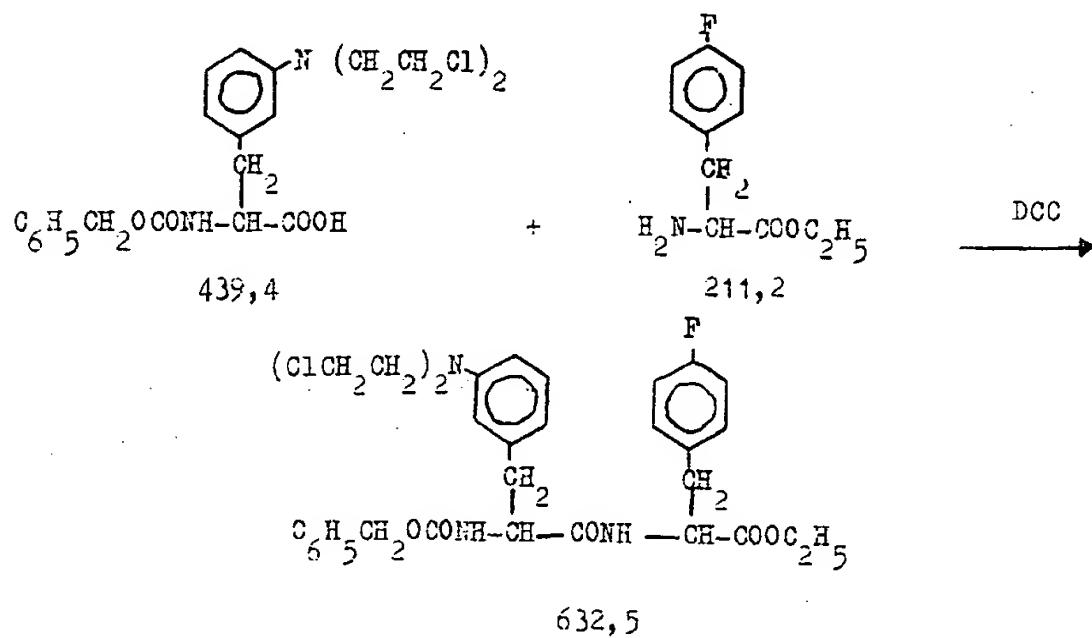


15 286,5 ml einer Chloroformlösung, die 0,1905 Mol L-p-Fluorphenylalaninethylester enthält, werden mit 83,7 g (0,1905 Mole) N-Cbzo-L-m-sarcolysin versetzt. Die Lösung wird auf einem Eisbad gekühlt.

Der gekühlten Lösung werden unter Rühren 41,25 g (0,200 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid - DCC) und 60 ml Chloroform dazugegeben, wobei die

20 Lösung während 30 min. unter gleichzeitiger Kühlung ständig gerührt wird. Unter Umständen kann die Mischung zu fester Masse erstarren. In diesem Fall wird die Masse durch Zugabe von 150 ml Chloroform wieder flüssig gemacht, wobei sie unter leichtem Erwärmen gerührt wird. Auf diese Weise wird die

Auflösung des ausgefallenen Produktes beschleunigt. Die Reaktion ist 2 h nach Zugabe des DDC beendet. Das Reaktionsende wird durch TLC-Kontrolle festgestellt (Dünnschichtchromatographie; Kieselgel G-Schicht, Lösungsmittel: Chloroform + Aceton 9:1, Sichtbarmachung durch Besprühen mit verdünnter, saurer KMnO_4 -Lösung). Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird durch Filtration abgetrennt. Die Lösung wird zuerst mit wenig Wasser, dann mit gesättigter Na_2CO_3 -Lösung gewaschen. Die Chloroformlösung wird noch einmal mit Wasser ausgeschüttelt und dann mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum verdampft und entfernt. Nach Trocknung werden 140,25 g leicht gelblich gefärbtes Produkt erhalten (Ausbeute 98,3%). Die gewonnene Substanz hat einen Schmelzpunkt von 123-124,5°C und ist chromatographisch homogen. Durch Kristallisation von 4,5 g Substanz aus 37,5 ml Ethylalkohol werden 3,75 g helleres Produkt gewonnen mit einem Schmelzpunkt von 125-126 °C. α_D^{20} : 27.7 (c = 2, CHCl_3).



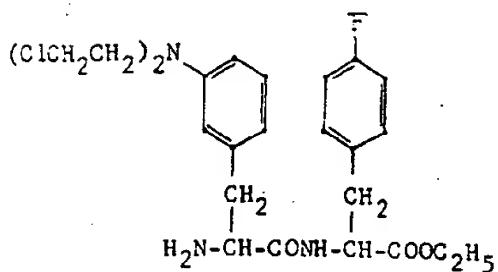
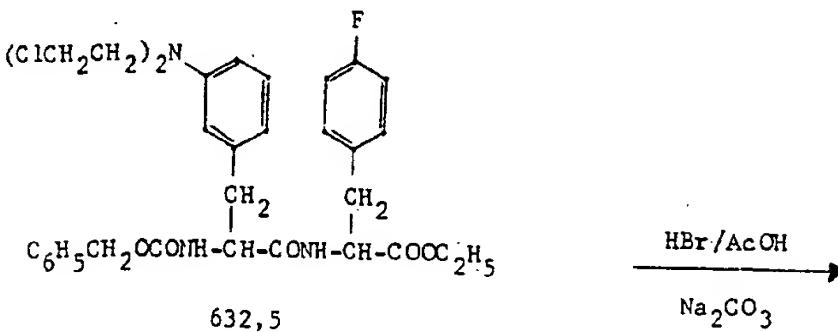
15

Analyse für $C_{32}H_{36}Cl_2FN_3O_5$

N% = 6,67 (berechnet 6,66)

CI% = 11,5 (berechnet = 11,2)

b) L-m-Sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanin-ethylester



498,4

Unter Ausschluss der Luftfeuchtigkeit werden zu 390 g (0, 616 mol)

die M-Carbobenzoxy-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanin-ethylester unter

- 5 langsamem Rühren 600 ml HBr in Eisessig (33 %) zugegeben. Die Auflösung und das Aufhören der CO_2 -Entwicklung findet nach 40 Minuten statt. Es wird während weiteren 20 Minuten unter Rühren stehengelassen und mit ca. 400 ml Ether verdünnt. Man giesst das gesamte in 5 l Ether, welcher unter ständigem Rühren gehalten wird, dekantiert und wäscht das ausgefallene Oel 2 x mit 2 l
- 10 Ether unter Dekantieren. Das Oel wird unter Rühren mit 4 l Wasser behandelt und man erhält einen Feststoff, welcher nach ca. 30 min. durch Filtration gesammelt wird und vollständig mit insgesamt 1500 ml Wasser und 500 ml Ether gewaschen wird. Das so erhaltene Bromhydrat wird in 2 l Ethylacetat suspendiert und unter Rühren mit 450 ml gesättigter Natriumcarbonatlösung

behandelt, derart bis die Lösung alkalisch ist. Nachdem die Auflösung stattgefunden hat, filtriert man auf der Nutsche, um den suspendierten Dicylohexylharnstoff (sehr wenig) zu entfernen. In einem Scheidetrichter trennt man die organische Schicht von der wässrigen Phase ab, und die wässrige

5 Phase wird mit weiteren 500 ml Ethylacetat extrahiert. Die gereinigten Extrakte werden mit 300 ml Wasser gewaschen, Na_2CO_3 getrocknet und mit Norit behandelt. Es wird filtriert und das Filtrat wird unter dem Vakuum getrocknet (40°C). Der Rückstand wird noch vor seiner Festigung in 500 bis 1000 ml Ether aufgenommen. Aus der erhaltenen Lösung wird während der Nacht ein weisses

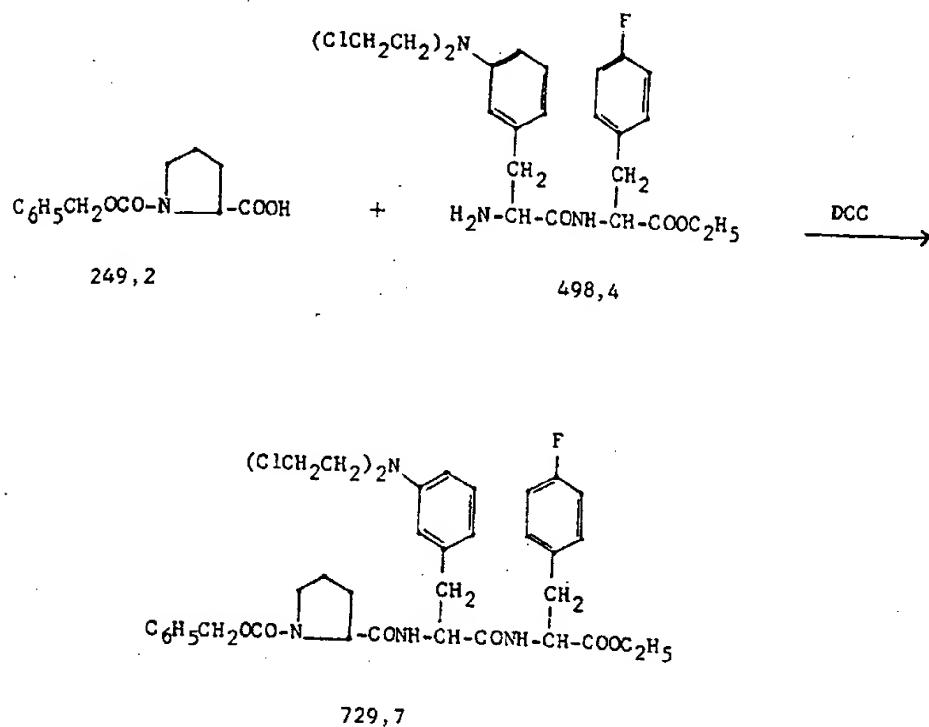
10 Produkt ausgefällt. Ausbeute: 247 g (80,4 %)

Smp. 100 -102 °C.

$\alpha_D^{20} = -7,5^\circ$ (c=2, Chloroform)
TLC (BuOH/AcOH/H₂O 65:15:25; KMnO₄ verdünnt):
Eine Bande, R_f = 0,74

15 Analyse für C₂₄H₃₀Cl₂FN₃O₃
N% = 8,34 (berechnet 8,43)
Cl% = 14,1 (berechnet 14,2)

c) N-Carbobenzoxy-L-prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorophenylalaninethylester



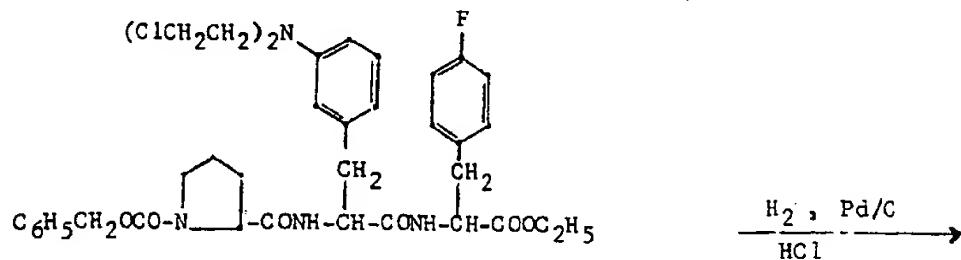
Eine Mischung von 249 g (0,5 mol) L-m-sarcolysyl-L-p-

- 5 fluorophenylalaninethylester, 125 g (0,5 mol) N-Cbz-L-Prolin und 109 g (0,525 mol) DCC in 3000 ml Chloroform wird während 30 Minuten unter Rühren stehen gelassen, mit externer Kühlung während weiteren 90 Minuten bei Zimmertemperatur (TLC, Silikagel G, Chf/Me₂CO 9:1; oder mit BuOH/AcOH/H₂O 65:15:25; KMnO₄, verdünnt, sauer). Nach der Entfernung des
- 10 Dicyclohexylharnstoff durch Filtration wird das Lösungsmittel unter Vakuum abgedampft und der Rückstand wird noch in flüssigem Zustand in 800 ml Ether gegossen. Von der erhaltenen Lösung fällt langsam das Produkt aus, welches auf einem Filter gesammelt wird. Ausbeute 290 g (78,5%).
 Smp. = 148-150°C, $\alpha_D^{20} = -42,4^\circ$ (c=2; Chloroform)

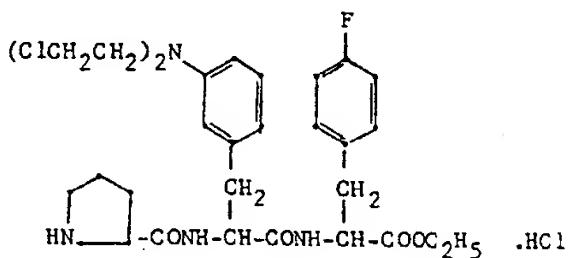
Analyse für $C_{37}H_{43}FCI_2N_4O_6$
 N% = 7,78% (berechnet 7,68)
 Cl% = 9,6 (berechnet 9,7)

d) L-Prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin-ethylester-hydrochlorid

5



729,7



632

Eine Mischung von 157,5 (0,261 mol) N-Carbobenzoxy-L-prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin-ethylester und 30 g Palladium auf Kohlenstoff 5% wird suspendiert unter einem Stickstoffstrom in 15 ml Eisessig und 1750 ml 10 Methanol. Die Reaktionsmischung wird unter Rühren gehalten und wird unter einem Wasserstoffstrom reduziert. Nach der Beendigung der CO_2 -Entwicklung (nach 4 -5 Stunden) wird eine TLC-Chromatographiekontrolle durchgeführt (Kieselgel G), wobei mit Chloroform-Aceton 9:1 eluiert wird und mit verdünntem $KMnO_4$ sichtbar gemacht wird.

Nachdem der Entfernung des Katalysators durch Filtration wird das Filtrat mit konzentrierter ethanolischer HCl in stöchiometrischer Menge oder wenig mehr angesäuert. Der weisse, kristalline Niederschlag, welcher sich langsam bildet, wird auf einem Filter gesammelt und mit Ethanol oder mit Ether gewaschen: 85 g. Das Filtrat wird praktisch bis zur Trockenheit konzentriert und der Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert: 25 g. Vollständige Ausbeute: 110 g (80, 5%); Smp. 122 - 124 °C (Änderung des Aggregatzustandes)

10 $\alpha_D^{20} = 13,0^\circ \pm 0,5$ (c= 2; MeOH)
TLC (Kieselgel G; BuOH/AcOH/H₂O 65:15:25; KMnO₄ verdünnt: eine Bande R_f = 0,54.
Analyse für C₂₉H₃₈Cl₃FN₄O₄
N % = 8,93% (berechnet 8,86)
Cl % = 16,7 % (berechnet 16,8)
Cl-% = 5,65% (berechnet 5,6)

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von L-Proyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin, eines Niederalkylesters und/oder von Säureadditionssalzen davon dadurch gekennzeichnet, dass L-p-Fluorphenylalanin mit einer geschützten Carboxyl-Gruppe mit L-m-Sarcolysin mit einer geschützten Aminogruppe und einer aktivierten Carboxy-Gruppe umgesetzt wird, wobei L-m-Sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin mit einer geschützten Aminogruppe und einer geschützten Carboxy-Gruppe erhalten wird und anschliessend die Aminoschutzgruppe abgespalten wird; danach das erhaltene L-m-Sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin mit einer geschützten Carboxy-Gruppe mit Prolin mit einer geschützten Aminogruppe und einer aktivierten Carboxy-Gruppe umgesetzt wird, wobei L-Proyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin mit einer geschützten Aminogruppe erhalten wird und die Amino-Schutzgruppe abgespalten und gegebenenfalls die Niederalkylestergruppe abgespalten oder in eine andere Estergruppe übergeführt wird und/oder die erhaltene Verbindung in ein Säureadditionssalz übergeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet dass die Kondensation unter Kühlung in einem wasserfreien Medium durchgeführt wird, z.B. in Chloroform.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die aktivierten Carboxy-Gruppen durch Behandlung mit Dicyclohexylcarbodiimid aktiviert wurden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Carboxy-Schutzgruppe von L-p-Fluorphenylalanin eine Niederalkylestergruppe, vorzugsweise eine Ethyestergruppe ist.

5

10

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminoschutzgruppe des L-m-Sarcolysin eine Carbobenzoxy-Gruppe ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Abspaltung der Aminoschutzgruppe des L-m-Sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanins mit einer geschützten Aminogruppe durch Behandlung mit Bromwasserstoff in Eisessig durchgeführt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Abspaltung der Aminoschutzgruppe des L-Prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanins mit einer geschützten Aminogruppe durch Reduktion mit Wasserstoff in Gegenwart von Palladium auf Kohlenstoff.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K5/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| P, X | WO 99 02177 A (PEPTICHEMIO AG ;MEHLEM FRANCESCO (CH)) 21 January 1999 see page 6 - page 9 ----- | 1-7 |
| A | BE 775 775 A (BELFANTI IST SIEROTERAP MILAN;BELFANTI) 16 March 1972 cited in the application ----- | |
| A | US 3 814 746 A (DE BARBIERI A) 4 June 1974 cited in the application ----- | |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

5 May 1999

12/05/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Deffner, C-A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Original Application No

PCT/CH 98/00498

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|---|------------------|
| WO 9902177 | A 21-01-1999 | AU 7904998 | A | 08-02-1999 |
| BE 775775 | A 16-03-1972 | NONE | | |
| US 3814746 | A 04-06-1974 | FR 2101226 | A | 31-03-1972 |
| | | GB 1329869 | A | 12-09-1973 |

A. KLASSEFIZIERTER ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| P, X | WO 99 02177 A (PEPTICHEMIO AG ; MEHLEM FRANCESCO (CH)) 21. Januar 1999 siehe Seite 6 - Seite 9 | 1-7 |
| A | BE 775 775 A (BELFANTI IST SIEROTERAP MILAN;BELFANTI) 16. März 1972 in der Anmeldung erwähnt | |
| A | US 3 814 746 A (DE BARBIERI A) 4. Juni 1974 in der Anmeldung erwähnt | |

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,

eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

5. Mai 1999

12/05/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Deffner, C-A

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

tales Aktenzeichen
PCT/CH 98/00498

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | | Datum der Veröffentlichung |
|---|----------------------------|--------------------------------|-----------|----------------------------|
| WO 9902177 A | 21-01-1999 | AU | 7904998 A | 08-02-1999 |
| BE 775775 A | 16-03-1972 | KEINE | | |
| US 3814746 A | 04-06-1974 | FR | 2101226 A | 31-03-1972 |
| | | GB | 1329869 A | 12-09-1973 |

091831816✓

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

| | | |
|---|---|---|
| Applicant's or agent's file reference 150031.1/FI/mb | FOR FURTHER ACTION | See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) |
| International application No. PCT/CH98/00498 | International filing date (day/month/year) 19 November 1998 (19.11.98) | Priority date (day/month/year) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 5/08 | | |
| Applicant PTC PHARMA AG | | |

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

| | |
|--|---|
| Date of submission of the demand 31 May 2000 (31.05.00) | Date of completion of this report 22 September 2000 (22.09.2000) |
| Name and mailing address of the IPEA/EP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/CH98/00498

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

 the international application as originally filed. the description, pages 1-12, as originally filed,

pages _____, filed with the demand,

pages _____, filed with the letter of _____

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims, Nos. 1-7, as originally filed,

Nos. _____, as amended under Article 19,

Nos. _____, filed with the demand,

Nos. _____, filed with the letter of _____

Nos. _____, filed with the letter of _____

 the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,

sheets/fig _____, filed with the demand,

sheets/fig _____, filed with the letter of _____

sheets/fig _____, filed with the letter of _____

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

 the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____

3. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/CH 98/00498**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

| | | | |
|-------------------------------|--------|-----|-----|
| Novelty (N) | Claims | 1-7 | YES |
| | Claims | | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | 1-7 | YES |
| | Claims | | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-7 | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations

1). The following documents listed in the international search report constitute prior art for the subject matter of the application according to Claims 1-7:

(D1) BE-A-775 775

(D2) US-A-38 14 746.

2). According to PCT Rules 64.3 and 70.10, the document WO-A-99 02 177 is not part of the prior art for this process. The applicant should be aware, however, that this document, which has a priority date of 7/7/97 and an international filing date of 7/7/98, could be considered prejudicial to the novelty of the subject matter of the application according to the present Claims 1-7 in the national European process, if the earlier application is filed with the EPO. On this matter, the applicant is referred to the synthesis steps on pages 6-9 of the earlier application.

3). In the light of (D1), Example 4 and (D2), rows 8-9, the problem that the present application seeks to solve can be defined as that of providing an alternative process for synthesising PSF.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

| |
|--|
| International application No. PCT/CH 98/00498 |
|--|

The present process differs from prior art in the different cross linkage of amino acids according to Schemas 1 (page 2) and 2 (page 4) of the present application, and can be considered novel in this respect (PCT Article 33(2)).

Since the applicant explains on pages 4-5 that the present process produces a yield of 50% compared with 30% in (D1) and (D2) in relation to mMphe and mPhe-ester, the product is easy to crystallise and easier to produce on an industrial scale, the present claims can be recognised as being inventive relative to (D1) and (D2). It would appear that a person skilled in the art could not foresee that a changed synthesis according to Claim 1 would result in such advantages (PCT Article 33(3)).

T 7

**VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

REC'D 26 SEP 2000

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT PCT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

| | | |
|---|---|--|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 150031.1/FI/mb | WEITERES VORGEHEN | siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416) |
| Internationales Aktenzeichen PCT/CH98/00498 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 19/11/1998 | Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 19/11/1998 |
| Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07K5/08 | | |
| Anmelder PEPTICHEMIO AG et al. | | |

| |
|--|
| <p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.</p> |
| <p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts II <input type="checkbox"/> Priorität III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderliche Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung |

| | |
|--|--|
| Datum der Einreichung des Antrags 31/05/2000 | Datum der Fertigstellung dieses Berichts 22.09.2000 |
| Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde: Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 | Bevollmächtigter Bediensteter Deffner, C-A Tel. Nr. +49 89 2399 8535 |



**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/CH98/00498

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-12 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-7 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

Beschreibung, Seiten:

Ansprüche, Nr.:

Zeichnungen, Blatt:

3. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N) Ja: Ansprüche 1-7
Nein: Ansprüche

Erfinderische Tätigkeit (ET) Ja: Ansprüche 1-7
Nein: Ansprüche

Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) Ja: Ansprüche 1-7
Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/CH98/00498

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

- 1). Folgende Dokumente aus dem Internationalen Recherchenbericht stehen als Stand der Technik für den Anmeldungsgegenstand gemäß den Ansprüchen 1- 7 zur Verfügung:
 - (D1) BE-A-775775
 - (D2) US-A-3814746
- 2). Gemäß Regel 64.3 und 70.10 PCT gehört das im Recherchenbericht zitierte Dokument WO-A-9902177 nicht zum Stand der Technik für dieses Verfahren. Die Anmelderin wird jedoch darauf hingewiesen daß dieses Dokument mit der Priorität vom 7/7/97 und Internationalem Anmeldedatum vom 7/7/98 im nationalen Europäischen Verfahren als neuheitsschädlich für den Anmeldungsgegenstand gemäß den vorliegenden Ansprüchen 1- 7 angesehen werden wird, sollte die frühere Anmeldung beim EPO eingereicht werden. Die Anmelderin wird diesbezüglich auf die Syntheseschritte auf den Seiten 6- 9 der früheren Anmeldung verwiesen.
- 3). Im Hinblick auf (D1), Beispiel 4, und (D2), Reihen 8- 9, kann das der vorliegenden Anmeldung zugrunde liegende Problem mit der Bereitstellung eines alternativen Verfahrens zur Synthese von PSF definiert werden.
Das vorliegende Verfahren unterscheidet sich vom Stande der Technik in einer unterschiedlichen Verknüpfungsweise der Aminosäuren gemäß Schemata 1 (Seite 2) und 2 (Seite 4) der vorliegenden Anmeldung und kann diesbezüglich als neu angesehen werden (Artikel 33(2) PCT).
Da die Anmelderin auf den Seiten 4- 5 ausführt, dass vorliegendes Verfahren eine Ausbeute von 50% gegenüber 30% von (D1)/(D2) bezogen auf mMPhE bzw mPhe- Ester aufweist, das Produkt leicht zu Kristallisieren ist und leichter in einem industriellen Maßstab herzustellen sei, kann eine erfinderische Tätigkeit der vorliegenden Ansprüche bezüglich (D1) und (D2) anerkannt werden. Es erscheint daß der Fachmann solche Vorteile durch eine veränderte Synthese gemäß Anspruch 1 nicht vorhersehen konnte (Artikel 33(3) PCT).

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

| | | |
|--|---|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 150031.1/FI/mb | WEITERES VORGEHEN | siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5 |
| Internationales Aktenzeichen PCT/CH 98/ 00498 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 19/11/1998 | (Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) |
| Anmelder PEPTICHEMIO AG et al. | | |

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 2 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. ////

wie vom Anmelder vorgeschlagen

weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

keine der Abb.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

CH 98/00498

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07K5/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| P, X | WO 99 02177 A (PEPTICHEMIO AG ;MEHLEM FRANCESCO (CH)) 21. Januar 1999 siehe Seite 6 - Seite 9 --- | 1-7 |
| A | BE 775 775 A (BELFANTI IST SIEROTERAP MILAN;BELFANTI) 16. März 1972 in der Anmeldung erwähnt --- | |
| A | US 3 814 746 A (DE BARBIERI A) 4. Juni 1974 in der Anmeldung erwähnt ----- | |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

| | |
|--|--|
| ° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : | "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist |
| "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist | "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden |
| "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist | "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist |
| "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) | "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist |
| "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht | |
| "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist | |

| | |
|---|---|
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts |
| 5. Mai 1999 | 12/05/1999 |
| Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Bevollmächtigter Bediensteter Deffner, C-A |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CH 98/00498

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|-----------|------------------|
| WO 9902177 A | 21-01-1999 | AU | 7904998 A | 08-02-1999 |
| BE 775775 A | 16-03-1972 | | NONE | |
| US 3814746 A | 04-06-1974 | FR | 2101226 A | 31-03-1972 |
| | | GB | 1329869 A | 12-09-1973 |

VERIFICATION OF TRANSLATION

I, the undersigned, hereby declare:

That my name and address are as stated below under my signature;

That I am conversant with the English and German languages; and

That the attached translation is a true translation prepared by me of the accompanying International Application No. PCT/CH 98/00498 filed on November 19, 1998.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true, and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any U.S. patent issued thereon.

May 7, 2001

Ann Kistler

(signature)
Ann Kistler
Friedlistrasse 4
CH-3006 Berne
Switzerland

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) 150031.1/FI/mb

Box No. I TITLE OF INVENTION

Method for Producing L-prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanine and Derivatives Thereof

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below).)

PEPTICHEMIO AG
c/o Notariat Daniel Barbier
Spitalgasse 29
3001 Bern (Switzerland)

This person is also inventor.

Telephone No.

Fax/fax No.

Telex/telep. No.

State (that is, country) of nationality:

Switzerland

State (that is, country) of residence:

Switzerland

This person is applicant for the purposes of: all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below).)

MEHLEM, Francesco
Lindenhofstr. 2
3048 Worblaufen (Switzerland)

This person is:

applicant only

applicant and inventor

inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

Italy

State (that is, country) of residence:

Switzerland

This person is applicant for the purposes of: all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

agent

common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

BOVARD LTD
Patent Attorneys
Optingenstr. 16
3000 Bern 25 (Switzerland)

Telephone No.

031/335 20 00

Fax/fax No.

031/332 81 59

Telex/telep. No.

911 907 bova ch

Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

DI VITTORIO, Pietro
Via A. Storza 65
I-20100 Milan (Italy)

This person is:

applicant only
 applicant and inventor
 inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:
ItalyState (that is, country) of residence:
Italy

This person is applicant for the purposes of: all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

applicant only
 applicant and inventor
 inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of: all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

applicant only
 applicant and inventor
 inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of: all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

applicant only
 applicant and inventor
 inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of: all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No.V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

AP ARIPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swaziland, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT

EA Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT

EP European Patent: AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT

OA OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

| | |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albania | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Austria and utility model | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia | <input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> PL Poland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic and utility model | <input checked="" type="checkbox"/> RO Romania |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Germany and utility model | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark and utility model | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia and utility model | <input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spain | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finland and utility model | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia and utility model |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatia | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia | |

Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

.....

.....

.....

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

 Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

| Filing date of earlier application (day/month/year) | Number of earlier application | Where earlier application is: | | |
|---|----------------------------------|----------------------------------|--|--|
| | | national application: country | regional application: regional Office | international application: receiving Office |
| item(1) | ----- | ----- | ----- | ----- |
| item(2) | ----- | ----- | ----- | ----- |
| item(3) | ----- | ----- | ----- | ----- |

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s):

* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA)
(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA /

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year)

Number

Country (or regional Office)

Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains the following number of sheets:

| | | |
|---|---|-------|
| request | : | 4 |
| description (excluding sequence listing part) | : | 12 |
| claims | : | 2 |
| abstract | : | 1 |
| drawings | : | ----- |
| sequence listing part of description | : | ----- |
| Total number of sheets | : | 19 |

This international application is accompanied by the item(s) marked below:

1. fee calculation sheet
2. separate signed power of attorney
3. copy of general power of attorney; reference number, if any:
4. statement explaining lack of signature
5. priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):
6. translation of international application into (language):
7. separate indications concerning deposited microorganism or other biological material
8. nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form
9. other (specify):

Figure of the drawings which should accompany the abstract: -----

Language of filing of the international application: German

Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

BOVARD LTD

J. Aebischer

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:

3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:

4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):

5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /

2. Drawings:

 received: not received:6. Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

TRANSLATION

Patent Cooperation Treaty

Appointment of an agent or common representative

The undersigned applicant(s) hereby appoint(s)

BOVARD LTD
Patent Attorneys
Optingenstrasse 16
CH-3000 Berne 25

to act before the competent international authorities concerning the international application filed with the Federal Institute of Intellectual Property, 3003 Berne, entitled:

"Method for Producing L-prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanine and Derivatives Thereof"

Agent's file reference: 150031.1/FI/mb

Number of the international application:

Bern, 28th September 1998

(place)

Peptichemio AG
Spitalgasse 29, 3011 Bern
Tel. 031 312 2006
(signature)

(signature(s) of the applicant(s))
Daniel BARBIER

28th September 1998

(date)

(Inventors)
Dr. Pietro di Vittorio
(signature)

Dr. Francesco Mehlem
(signature)

Please typewrite the name under each signature.

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) 150031.1/F1/mb
Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG
 Verfahren zur Herstellung von L-prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin und von Derivaten davon

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

PEPTICHEMIO AG
c/o Notariat Daniel Barbier
Spitalgasse 29
3001 Bern (Schweiz)

Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):
SchweizSitz oder Wohnsitz (Staat):
Schweiz

Diese Person ist Anmelder alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

MEHLEM Francesco
Lindenhofstr. 2
3048 Worblaufen (Schweiz)

Diese Person ist:

 nur Anmelder Anmelder und Erfinder nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)Staatsangehörigkeit (Staat):
ItalienSitz oder Wohnsitz (Staat):
Schweiz

Diese Person ist Anmelder alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: Anwalt gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

BOVARD AG
Patentanwälte
Optingenstr. 16
3000 Bern 25 (Schweiz)

Telefonnr.:

031/335.20.00

Telefaxnr.:

031/332.81.59

Fernschreibnr.:

911 907 bova ch

Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigefügt werden.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

DI VITTORIO Pietro
Via A. Storza 65
I-20100 Milano (Italien)

Diese Person ist:

 nur Anmelder Anmelder und Erfinder nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)Staatsangehörigkeit (Staat):
ItalienSitz oder Wohnsitz (Staat):
Italien

Diese Person ist Anmelder alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

 nur Anmelder Anmelder und Erfinder nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

 nur Anmelder Anmelder und Erfinder nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

 nur Anmelder Anmelder und Erfinder nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Siehe Anmerkungen zu diesem Antragsformular

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

AP ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist

EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidschan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist

EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist

OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben) **GW Guinea-Bissau**

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

| | | |
|--|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho | |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien | <input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen | |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Österreich | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxemburg | |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland | |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidschan | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input checked="" type="checkbox"/> X Mazedonien | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi | |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko | |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen | |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland | |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen | |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal | |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Deutschland | <input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien | |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Dänemark | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation | |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estland | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spanien | <input checked="" type="checkbox"/> SE Schweden | |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur | |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien | |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei | |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone | |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Kroatien | <input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei | |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago | |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine | |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda | |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Island | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika | |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Usbekistan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenia | <input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Simbabwe | |
| <input type="checkbox"/> KR Republik Korea | Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind: | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan | <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | <input type="checkbox"/> | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | <input type="checkbox"/> | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia | <input type="checkbox"/> | |

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

| Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH | | <input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. | | |
|---|--|--|--|---|
| Anmeldeatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr) | Aktenzeichen der früheren Anmeldung | Ist die frühere Anmeldung eine: | | |
| | | nationale Anmeldung: Staat | regionale Anmeldung: regionales Amt | internationale Anmeldung: Anmeldeamt |
| Zeile (1) | ----- | ----- | | |
| Zeile (2) | | | | |
| Zeile (3) | | | | |

Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist)
* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

Wah der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden)

Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):

Datum (Tag/Monat/Jahr) Aktenzeichen Staat (oder regionales Amt)

ISA/

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE

Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern:

| | | |
|--|---|-------|
| Antrag | : | 4 |
| Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) | : | 12 |
| Ansprüche | : | 2 |
| Zusammenfassung | : | 1 |
| Zeichnungen | : | --- |
| Sequenzprotokollteil der Beschreibung | : | ----- |
| Blattzahl insgesamt | : | 19 |

Dieser internationale Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

1. Blatt für die Gebührenberechnung
2. Gesonderte unterzeichnete Vollmacht
3. Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):
4. Begründung für das Fehlen einer Unterschrift
5. Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet:
6. Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:
7. Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material
8. Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form
9. Sonstige (einzelnen aufführen):

Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):

Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird:

Deutsch

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

BOVARD AG

J. Aeischer

Vom Anmeldeamt auszufüllen

| | |
|--|---|
| 1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung: | 2. Zeichnungen eingegangen: <input type="checkbox"/> |
| 3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung: | <input type="checkbox"/> nicht eingegangen: |
| 4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT: | |
| 5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): | ISA / |
| 6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchengebühr aufgeschoben | |

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

Siehe Anmerkungen zu diesem Antragsformular

Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT)

Benennung eines Anwaltes oder eines gemeinsamen Vertreters

Der (die) unterzeichnende(n) Anmelder ernennt (ernennen) hiermit

BOVARD AG
Patentanwälte
Optingenstrasse 16
CH-3000 Bern 25

um bei den zuständigen internationalen Behörden aufzutreten, betreffend die beim Eidgenössischen Institut für Geistiges Eigentum, 3003 Bern, einge-reichte internationale Anmeldung mit folgendem Titel:

"Verfahren zur Herstellung von L-prolyl-L-m-sarcolysyl-L- β -fluorphenylalanin und von Derivaten davon"

Aktenzeichen des Vertreters: 150031.1/FI/mb

Nummer der internationalen Anmeldung:

Bern 28/9/1998

(Ort)

Peptichemie AG
Spitalgasse 29, 3011 Bern
Tel. 031 312 20 06

(Unterschrift(en) des (der) Anmelder

Daniel BARBIER

28/9/1998

(Datum)

(Erfinder)

Dr. Pietro di Mita

Bitte den Namen in Maschinenschrift unter jeder Unterschrift anbringen.

Verfahren zur Herstellung von L-pr Iyl-L-m-sarc lysyl-L-p-fluorphenylalanin und von Derivaten davon

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutisch aktiven Peptidverbindung, die L-m-Sarcolysin als Aminosäurebaustein enthält. Der Wirkstoff dient insbesondere zur Chemotherapie gegen Krebsleiden, besonders gegen Melanome. Bei Verwendung einer Trägersubstanz auf Basis von Cyclodextrin wird der Wirkstoff verzögert freigesetzt, was eine genügende Bioverfügbarkeit während einer ausreichend langen Zeitdauer ermöglicht.

Ein Komplex von sechs Peptiden, die m-L-Sarcolysin enthalten, ist unter dem Warennamen „Peptichemio“ (Istituto Sieroterapico Milanese S. Belfanti, Milano, IT) für die Chemotherapie gegen Krebs bekannt geworden. Es wurde gefunden, dass die Aktivität der einzelnen Peptide verschieden ist und dass besonders ein Vertreter eine sehr hohe Toxizität für Melanomzellen aufweist. Die Peptide sind eine Entwicklung, welche mit dem Produkt „Melphalan“, d.h. 4-[bis(2-Chlorethyl)]-amino-L-phenylalanin begonnen hat. Es wurde gefunden, dass dieses Produkt eine zytostatische Wirkung hat und sowohl für die Myelom- als auch für die Melanomtherapie eingesetzt werden kann. Zur Weiterentwicklung des Wirkstoffes wurden Derivate des Produktes hergestellt. Daraus resultierte auch das L-m-Sarcolysin [= m-{Di-2-chlorethyl)amino}-L-phenylalanin], das weiter deriviert wurde, indem Peptide hergestellt wurden, welche die modifizierte Aminosäure als Baustein enthielten. Eine Kombination der 6 Oligopeptiden L-Seryl-L-p-fluorphenylalanyl-L-m-sarcolysyl-ethylester; L-Proyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanyl-ethylester; L-m-Sarcolysyl-N-nitro-L-arginyl-L-norvalin-ethylester; L-p-Fluorphenylalanyl-L-m-sarcolysil-L-asparagin-ethylester; Fluorphenylalanyl-glycyl-L-m-sarcolysyl-norvalin-ethylester und L-m-Sarcolysyl-L-arginyl-L-lysyl-L-m-sarcolysyl-L-histidin-methylester bildete das aktive Prinzip der Antitumormittel „Peptichemio“. Von den 6 Peptiden haben sich das L-Proyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin (PSF) und seine Niederalkylester als besonders geeignet erwiesen.

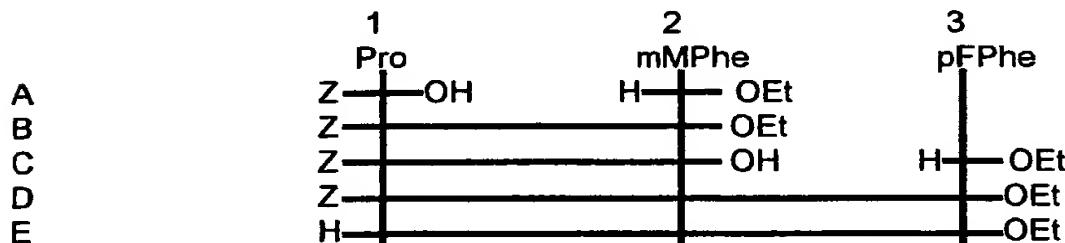
Es wurde gefunden, dass PSF eine beträchtlich höhere Zytotoxizität im Vergleich zum Peptichemio selbst zeigte (R. Levenson, et al., Radiumhemmet, Karolinska Hospital, Stockholm SE, Eur. J. Cancer Clin. Oncol.; 23: 6, 783-788, 1987). Gemäss diesen Studien wurde gefunden, dass

5 das Peptid L-Propyl-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin (PSF) 35 x bzw. 28 x toxischer gegen RPMI 8322 Melanomzellen war als Melphalan bzw. m-Sarcolysin. Ähnliche Unterschiede zwischen den Wirkstoffen wurden auch für andere Melanomzelllinien gefunden.

Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur

10 Herstellung von PSF Verfügung zu stellen, das eine wirtschaftliche und sichere Herstellung des Wirkstoffes ermöglicht.

Die Herstellung einer solchen Verbindung ist in den Druckschriften BE-A-775775 und US-A-3 814 746 beschrieben. Die beschriebene Herstellung erfolgt nach dem nachstehenden Schema 1:



15

Pro = Prolin
 mMPhe = m-[Di(2-chlorethyl)]-amino-L-phenylalanin
 pFPhe = p-Fluor-L-phenylalanin
 Z = Benzyloxycarbonyl

20 Das obige Schema zeigt in Stufe A die Kondensation des N-Carbobenzoxy-L-prolin mit dem Ethylester von m-[Di-(2-chlorethyl)-amino]-L-phenylalanin, wobei das entsprechende geschützte Peptid entsteht, wie dies bei Stufe B im Schema 1 gezeigt ist.

In Stufe C erhält man das N-Carbobenzoxy-L-prolyl-m-[di-(2-chlorethyl)-amino]-L-phenylalanin aus dem N-Carbobenzoxy-L-prolyl-m-[di-(2-chlorethyl)-amino]-L-phenylalaninethylester und anschliessend führt man die Kondensation dieser Verbindung mit p-Fluor-L-phenylalaninethylester durch, wobei man in Stufe D des Schemas 1 den Carbobenzoxy-L-prolyl-m-[di-(2-chlorethyl)amino]-L-phenylalanin-p-chlor-L-phenylalaninethylester erhält.

Man eliminiert darauf die Schutzgruppe, wobei man in Stufe E des Schemas 1 ankommt, wobei das Endprodukt der L-Prolyl-m-[di-(2-chlorethyl)amino]-L-alanin-p-fluor-L-phenylalaninethylester ist.

- 10 Die Reaktionsbedingungen sind solche, welche im allgemeinen bei Peptidsynthesen verwendet werden. Beim obigen Verfahren wird das Endprodukt mit einer Ausbeute von 30 % erhalten, bezogen auf das Ausgangsprodukt m-[Di-(2-chlorethyl)amino]-L-phenylalaninethylester, wobei die Reinigung mindestens eines Zwischenproduktes durch
- 15 Säulenchromatographie auf Kieselgel durchgeführt werden muss.

Tatsächlich ist das Verfahren industriell anwendbar, jedoch ist es verhältnismässig kompliziert und führt zu einer eher ungenügenden Ausbeute.

Zieht man die Eigenschaften des Endproduktes PSF-Hydrochlorid in Betracht, ist die Verwirklichung eines anderen Herstellungsverfahrens, welches leicht

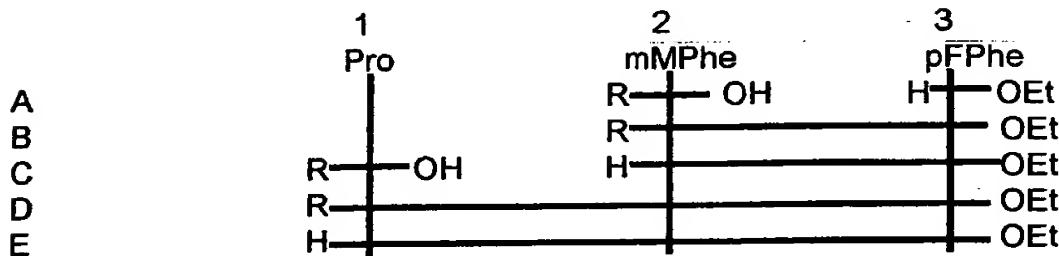
- 20 industriell angewandt werden kann, welches bessere Ausbeuten gegenüber demjenigen des Standes der Technik ergibt, eine aussergewöhnlich wichtige und interessante Aufgabe der vorliegenden Erfindung.

Es wurde gefunden, dass das erfindungsgemäss Herstellungsverfahren von PSF, das eine andere Reaktionsfolge verwendet, dem Verfahren des Standes

- 25 der Technik überlegen ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist demzufolge das im Patentanspruch 1 definierte Verfahren zur Herstellung von L-Prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin und von Estern und/oder Salzen davon.

Das erfindungsgemäße Verfahren erfolgt gemäss dem nachstehenden Schema 2:



Pro = Prolin

5 mMPhe = m-[Di(2-chlorethyl)]-amino-L-phenylalanin (=L-m-Sarcolysin)

pFPhe = p-Fluor-L-phenylalanin

R = Benzyloxycarbonyl, t-Butyloxycarbonyl (BOC) oder
9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)

Das Verfahren umfasst folgende Verfahrensschritte, die im obigen Schema 2
10 dargestellt sind:

- a) Kondensation von R-m-[Di-(2-chlorethyl)amino]-L-phenylalanin mit p-Fluor-L-phenylalaninethylester, wobei R-m-[Di-2-chlorethyl]amino]-L-phenylalanyl-p-fluor-L-phenylalaninethylester erhalten wird;
- b) Abspaltung der Schutzgruppe R;
- 15 c) Kondensation des im Schritt b) erhaltenen Produktes mit R-L-Prolin, wobei R-L-Prolyl-m-[di-(2-chlorethyl)amino]-L-phenylalanyl-p-fluor-L-phenylalaninethylester erhalten wird;
- d) Abspaltung der Schutzgruppe R und Synthese des Hydrochlorides;
- 20 R kann Benzyloxycarbonyl, t-Butyloxycarbonyl oder 9-Fluorenylmethoxycarbonyl sein. R ist vorzugsweise eine Benzyloxycarbonylgruppe.

Das Verfahren gemäss der vorliegenden Erfindung zeigt eine Ausbeute von insgesamt 50 % bezogen auf das Ausgangsprodukt R-m-[Di-(2-chlorethyl)amino]-L-phenylalanin.

Das Verfahren gemäss der vorliegenden Erfindung zeigt einen grossen Vorteil zur Durchführung der Synthese des Endproduktes, da kristalline Zwischenprodukte erhalten werden, welche aussergewöhnlich leicht durch Kristallisation gereinigt werden können.

5 Die Merkmale und die Vorteile des erfindungsgemässen Verfahrens sollen zum besseren Verständnis durch die nachstehende Beschreibung erläutert werden. Das Tripeptid, welches nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellt wird, wird gemäss dem obigen Schema 2 hergestellt. Darin ist R eine Benzyloxycarbonyl oder t-Butoxycarbonylgruppe (BOC) oder
10 eine 9-Fluorenylmethoxycarbonylgruppe (Fmoc).

Das Verfahren sieht, wie aus dem Schema 2 hervorgeht, in Stufe A die Kondensation von R-m-[Di-2-chlorethyl]amino]-L-phenylalanin mit dem Ethylester des p-fluorphenylalanins vor, wobei in Stufe B das entsprechende geschützte Tripeptid entsteht.

15 In Stufe C wird die Benzyloxycarbonylgruppe entfernt, und durch eine Kondensation des R-L-Prolins mit m-[Di-(2-chlorethyl)amino]-L-phenylalanyl-p-fluor-L-phenylalaninethylester wird in Stufe D des Schemas 2 das R-L-Prolyl-m-[Di-2-chlorethyl]amino]-L-phenylalanyl-p-fluor-L-phenylalaninethylester erhalten.

20 Die Schutzgruppe R wird in Stufe E des Schemas 2 abgespalten, wobei das Endprodukt L-prolyl-m-[Di-(2-chlorethyl)amino]-phenylalanyl-p-fluor-phenylalaninethylester ist.

Die Reaktionsbedingungen sind solche, wie sie im allgemeinen bei der Peptidsynthese üblich sind.

25 Das Peptid L-Prolyl-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin (PSF) wird vorzugsweise in Form von Hydrochloriden oder Hydrobromiden hergestellt.

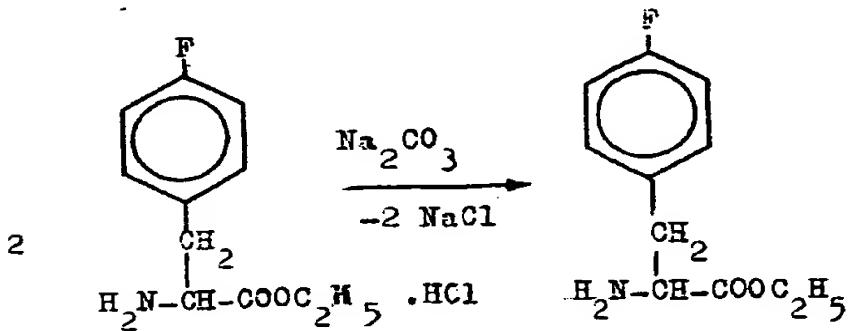
Das nachstende Beispiel dient der Erläuterung der vorliegenden Erfindung.

Beispiel:

Synthese von L-prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin-ethylester-hydrochlorid

a) N-Carbobenzoxy-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin-ethylester

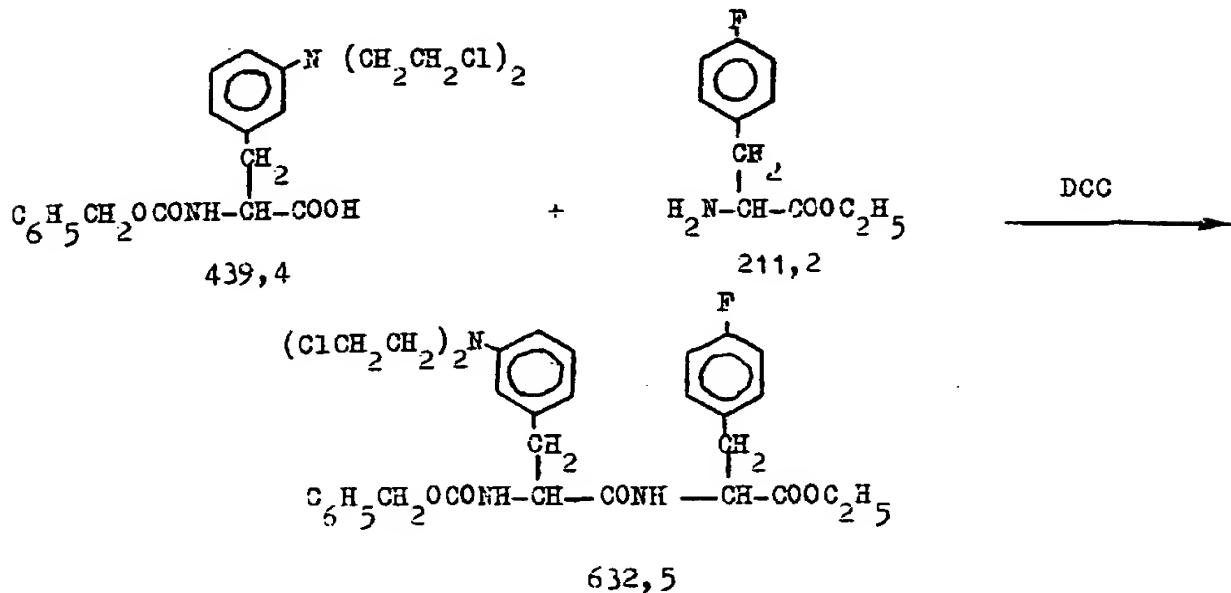
5 52,5 g L-p-Fluorphenylalaninethylester Hydrochlorid werden mit 75 ml Na_2CO_3 (Natriumcarbonat) gesättigte Lösung und 150 ml CHCl_3 behandelt. Die Mischung wird ausgeschüttelt und die organische Phase wird getrennt und aufbewahrt. Die wässrige Phase wird mit 75 ml CHCl_3 ein zweites Mal ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformextrakte werden gemischt und 10 einmal mit Wasser gewaschen, und dann von der wässrigen Phase getrennt und auf wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet. Die Konzentration von Aminosäureester wird durch eine Titration mit HClO_4 (Perchlorsäure) bestimmt. Die Ausbeute entspricht ungefähr dem theoretischen Wert; sie liegt bei 98%.



15 286,5 ml einer Chloroformlösung, die 0,1905 Mol L-p-Fluorphenylalaninethylester enthält, werden mit 83,7 g (0,1905 Mole) N-Cbz-L-m-sarcolysin versetzt. Die Lösung wird auf einem Eisbad gekühlt.

Der gekühlten Lösung werden unter Rühren 41,25 g (0,200 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid - DCC) und 60 ml Chloroform dazugegeben, wobei die 20 Lösung während 30 min. unter gleichzeitiger Kühlung ständig gerührt wird. Unter Umständen kann die Mischung zu fester Masse erstarren. In diesem Fall wird die Masse durch Zugabe von 150 ml Chloroform wieder flüssig gemacht, wobei sie unter leichtem Erwärmen gerührt wird. Auf diese Weise wird die

Auflösung des ausgefallenen Produktes beschleunigt. Die Reaktion ist 2 h nach Zugabe des DDC beendet. Das Reaktionsende wird durch TLC-Kontrolle festgestellt (Dünnsschichtchromatographie; Kieselgel G-Schicht, Lösungsmittel: Chloroform + Aceton 9:1, Sichtbarmachung durch Besprühen mit verdünnter, 5 saurer KMnO_4 -Lösung). Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird durch Filtration abgetrennt. Die Lösung wird zuerst mit wenig Wasser, dann mit gesättigter Na_2CO_3 -Lösung gewaschen. Die Chloroformlösung wird noch einmal mit Wasser ausgeschüttelt und dann mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum verdampft und entfernt. Nach Trocknung 10 werden 140,25 g leicht gelblich gefärbtes Produkt erhalten (Ausbeute 98,3%). Die gewonnene Substanz hat einen Schmelzpunkt von 123-124,5°C und ist chromatographisch homogen. Durch Kristallisation von 4,5 g Substanz aus 37,5 ml Ethylalkohol werden 3,75 g helleres Produkt gewonnen mit einem Schmelzpunkt von 125-126 °C. α_D^{20} : 27.7 (c = 2, CHCl_3).



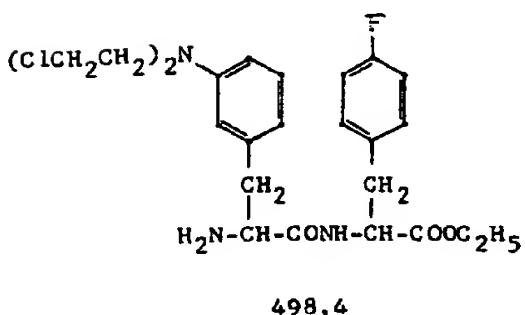
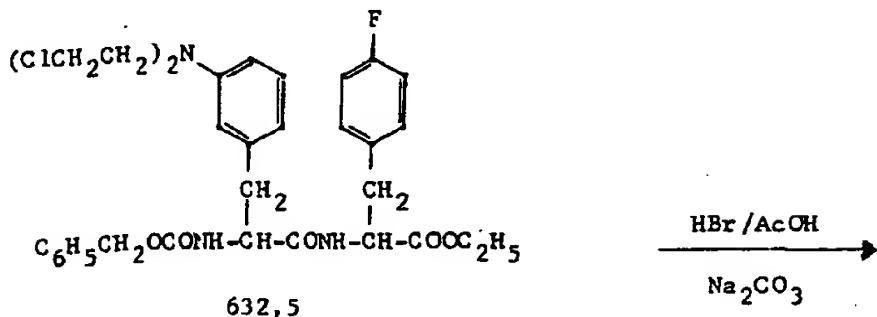
15

Analyse für $C_{32}H_{36}Cl_2FN_3O_5$

N% = 6,67 (berechnet 6,66)

CI% = 11,5 (berechnet = 11,2)

b) L-m-Sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin-ethylester



Unter Ausschluss der Luftfeuchtigkeit werden zu 390 g (0, 616 mol)

die M-Carbobenzoxy-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin-ethylester unter

- 5 langsamem Rühren 600 ml HBr in Eisessig (33 %) zugegeben. Die Auflösung und das Aufhören der CO_2 -Entwicklung findet nach 40 Minuten statt. Es wird während weiteren 20 Minuten unter Rühren stehengelassen und mit ca. 400 ml Ether verdünnt. Man giesst das gesamte in 5 l Ether, welcher unter ständigem Rühren gehalten wird, dekantiert und wäscht das ausgefallene Öl 2 x mit 2 l
- 10 Ether unter Dekantieren. Das Öl wird unter Rühren mit 4 l Wasser behandelt und man erhält einen Feststoff, welcher nach ca. 30 min. durch Filtration gesammelt wird und vollständig mit insgesamt 1500 ml Wasser und 500 ml Ether gewaschen wird. Das so erhaltene Bromhydrat wird in 2 l Ethylacetat suspendiert und unter Rühren mit 450 ml gesättigter Natriumcarbonatlösung

behandelt, derart bis die Lösung alkalisch ist. Nachdem die Auflösung stattgefunden hat, filtriert man auf der Nutsche, um den suspendierten Dicylohexylharnstoff (sehr wenig) zu entfernen. In einem Scheidetrichter trennt man die organische Schicht von der wässrigen Phase ab, und die wässrige

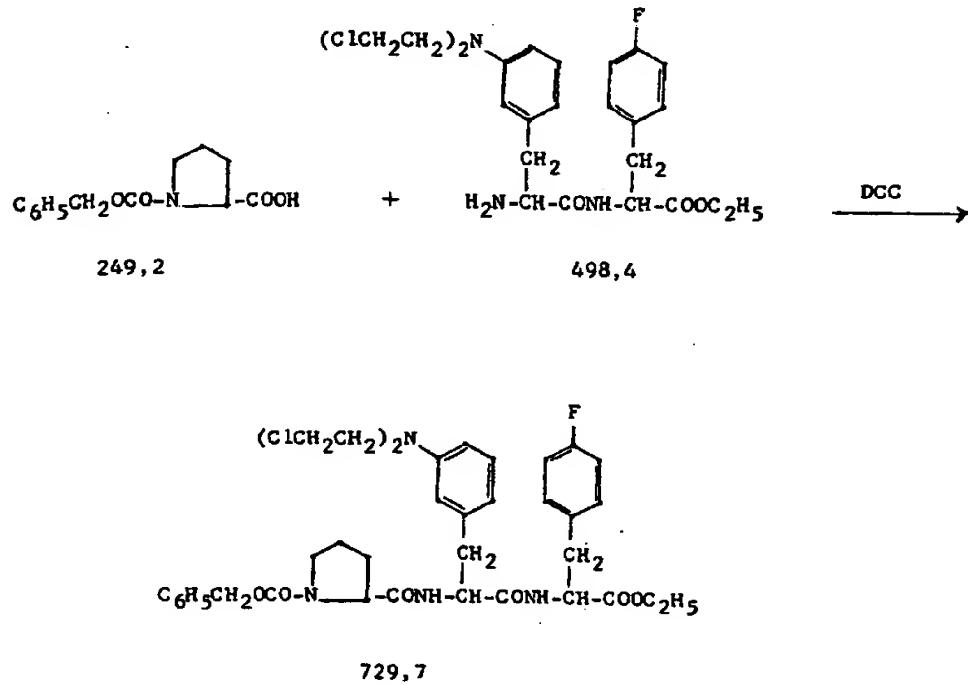
5 Phase wird mit weiteren 500 ml Ethylacetat extrahiert. Die gereinigten Extrakte werden mit 300 ml Wasser gewaschen, Na_2CO_4 getrocknet und mit Norit behandelt. Es wird filtriert und das Filtrat wird unter dem Vakuum getrocknet (40°C). Der Rückstand wird noch vor seiner Festigung in 500 bis 1000 ml Ether aufgenommen. Aus der erhaltenen Lösung wird während der Nacht ein weisses

10 Produkt ausgefällt. Ausbeute: 247 g (80,4 %)

Smp. 100 -102 °C.

15 $\alpha_D^{20} = -7,5^\circ$ (c=2, Chloroform)
TLC (BuOH/AcOH/H₂O 65:15:25; KMnO₄ verdünnt):
Eine Bande, R_f = 0,74
Analyse für C₂₄H₃₀Cl₂FN₃O₃
N% = 8,34 (berechnet 8,43)
Cl% = 14,1 (berechnet 14,2)

c) N-Carbobenzoxy-L-prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalaninethylester



Eine Mischung von 249 g (0,5 mol) L-m-sarcolysyl-L-p-

5 fluorphenylalaninethylester, 125 g (0,5 mol) N-Cbzo-L-Prolin und 109 g (0,525 mol) DCC in 3000 ml Chloroform wird während 30 Minuten unter Rühren stehen gelassen, mit externer Kühlung während weiteren 90 Minuten bei Zimmertemperatur (TLC, Silikagel G, Chf/Me₂CO 9:1; oder mit BuOH/AcOH/H₂O 65:15:25; KMnO₄, verdünnt, sauer). Nach der Entfernung des

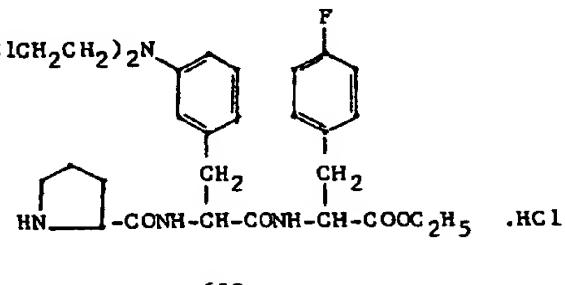
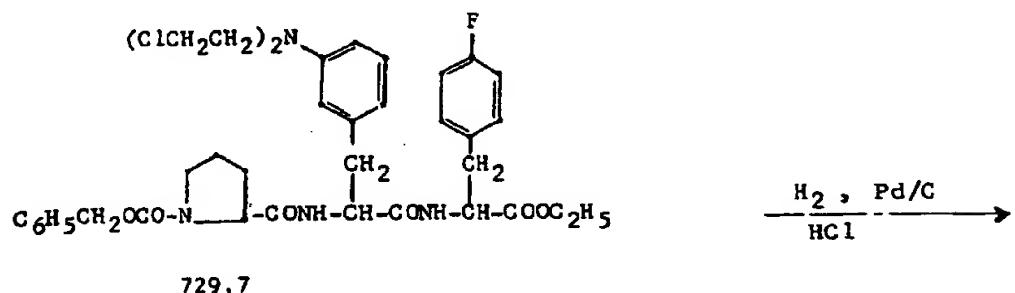
10 Dicyclohexylharnstoff durch Filtration wird das Lösungsmittel unter Vakuum abgedampft und der Rückstand wird noch in flüssigem Zustand in 800 ml Ether gegossen. Von der erhaltenen Lösung fällt langsam das Produkt aus, welches auf einem Filter gesammelt wird. Ausbeute 290 g (78,5%).

Smp. = 148-150°C, $\alpha_D^{20} = -42,4^\circ$ (c=2; Chloroform)

Analyse für $C_{37}H_{43}FCl_2N_4O_6$
 N% = 7,78% (berechnet 7,68)
 Cl% = 9,6 (berechnet 9,7)

d) L-Proyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin-ethylester-hydrochlorid

5



Eine Mischung von 157,5 (0,261 mol) N-Carbobenzoxy-L-proyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin-ethylester und 30 g Palladium auf Kohlenstoff 5% wird suspendiert unter einem Stickstoffstrom in 15 ml Eisessig und 1750 ml

10 Methanol. Die Reaktionsmischung wird unter Rühren gehalten und wird unter einem Wasserstoffstrom reduziert. Nach der Beendigung der CO_2 -Entwicklung (nach 4 -5 Stunden) wird eine TLC-Chromatographiekontrolle durchgeführt (Kieselgel G), wobei mit Chloroform-Aceton 9:1 eluiert wird und mit verdünntem KMnO_4 sichtbar gemacht wird.

Nachdem der Entfernung des Katalysators durch Filtration wird das Filtrat mit konzentrierter ethanolischer HCl in stöchiometrischer Menge oder wenig mehr angesäuert. Der weisse, kristalline Niederschlag, welcher sich langsam bildet, wird auf einem Filter gesammelt und mit Ethanol oder mit Ether gewaschen: 85 g. Das Filtrat wird praktisch bis zur Trockenheit konzentriert und der Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert: 25 g. Vollständige Ausbeute: 110 g (80, 5%); Smp. 122 - 124 °C (Änderung des Aggregatzustandes)

10 $\alpha_D^{20} = 13,0^\circ \pm 0,5$ (c= 2; MeOH)
TLC (Kieselgel G; BuOH/AcOH/H₂O 65:15:25; KMnO₄ verdünnt: eine Bande R_f = 0,54.
Analyse für C₂₉H₃₈Cl₃FN₄O₄
N % = 8,93% (berechnet 8,86)
Cl % = 16,7 % (berechnet 16,8)
Cl-% = 5,65% (berechnet 5,6)

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von L-Proyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin, eines Niederalkylesters und/oder von Säureadditionssalzen davon dadurch gekennzeichnet, dass L-p-Fluorphenylalanin mit einer geschützten Carboxyl-Gruppe mit L-m-Sarcolysin mit einer geschützten Aminogruppe und einer aktivierten Carboxy-Gruppe umgesetzt wird, wobei L-m-Sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin mit einer geschützten Carboxy-Gruppe erhalten wird und anschliessend die Aminoschutzgruppe abgespalten wird; danach das erhaltene L-m-Sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin mit einer geschützten Carboxy-Gruppe mit Prolin mit einer geschützten Aminogruppe und einer aktivierten Carboxy-Gruppe umgesetzt wird, wobei L-Proyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin mit einer geschützten Aminogruppe erhalten wird und die Amino-Schutzgruppe abgespalten und gegebenenfalls die Niederalkylestergruppe abgespalten oder in eine andere Estergruppe übergeführt wird und/oder die erhaltene Verbindung in ein Säureadditionssalz übergeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet dass die Kondensation unter Kühlung in einem wasserfreien Medium durchgeführt wird, z.B. in Chloroform.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die aktivierten Carboxy-Gruppen durch Behandlung mit Dicyclohexylcarbodiimid aktiviert wurden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Carboxy-Schutzgruppe von L-p-Fluorphenylalanin eine Niederalkylestergruppe, vorzugsweise eine Ethyestergruppe ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminoschutzgruppe des L-m-Sarcolysin eine Carbobenzoxy-Gruppe ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Abspaltung der Aminoschutzgruppe des L-m-Sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanins mit einer geschützten Aminogruppe durch Behandlung mit Bromwasserstoff in Eisessig durchgeführt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Abspaltung der Aminoschutzgruppe des L-Proyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanins mit einer geschützten Aminogruppe durch Reduktion mit Wasserstoff in Gegenwart von Palladium auf Kohlenstoff.

Zusammenfassung

Es werden L-Proyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin, der Niederalkylesters und/oder Säureadditionssalzen davon hergestellt. Hierzu wird L-p-Fluorphenylalanin mit einer geschützten Carboxyl-Gruppe mit L-m-

- 5 Sarcolysin mit einer geschützten Aminogruppe vorzugsweise unter Kühlung in einem wasserfreien Medium in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid umgesetzt, wobei L-m-Sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin mit einer geschützten Aminogruppe und einer geschützten Carboxyl-Gruppe erhalten wird. Anschliessend wird die Aminoschutzgruppe abgespalten, unter Bildung von L-
- 10 m-Sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin mit einer geschützten Carboxyl-Gruppe. Das erhaltene Produkt wird mit Prolin mit einer geschützten Aminogruppe in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid umgesetzt. Es wird L-Proyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin mit einer geschützten Aminogruppe erhalten. Schliesslich wird die Amino-Schutzgruppe abgespalten und gegebenenfalls die
- 15 Niederalkylestergruppe abgespalten und/oder die erhaltene Verbindung in ein Säureadditionssalz übergeführt.